



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 03 980 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 12 Q 1/56
G 01 N 33/80
// C12Q 1/37, C12N
9/99

⑳ Aktenzeichen: P 42 03 980.0
㉔ Anmeldetag: 11. 2. 92
㉕ Offenlegungstag: 12. 8. 93

DE 42 03 980 A 1

㉑ Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

㉒ Vertreter:

Kraus, W., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Weisert, A.,
Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Spies, J., Dipl.-Phys.,
Pat.-Anwälte; Nielsen, F., Dr., Rechtsanw., 8000
München

㉓ Erfinder:

Nowack, Götz, Dr.med.habil., O-5083 Erfurt, DE;
Bucha, Elke, Dr.med., O-5032 Erfurt, DE; Hoffmann,
Jutta, O-5080 Erfurt, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Bestimmung von Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren

- ⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren im Blut oder in Blutbestandteilen, gemäß welchem zu dem Blut oder dem Blutbestandteil ein Prothrombin-Intermediat, eine Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Salz davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen sowie gegebenenfalls Puffer und/oder andere übliche Zusatzstoffe gegeben werden und die Zeit, die von der Zugabe bis zum Beginn der Gerinnung vergeht, gemessen wird. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Mittel zur Durchführung des Verfahrens, das ein Prothrombin-Intermediat, eine Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Salz davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen gegebenenfalls zusammen mit Puffern und/oder anderen üblichen Zusatzstoffen enthält.

DE 42 03 980 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren im Blut sowie ein Mittel zur Durchführung des Verfahrens.

Hirudin, das aus der Speicheldrüse von *Hirudo medicinalis* (Blutegel) gewonnen wird, ist ein Antikoagulans, dessen Wirkung auf der Bildung einer chemischen Verbindung mit Thrombin beruht, wodurch dessen katalytische Wirkung inhibiert wird. Hirudin ist ein Miniprotein aus 65 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 7 kD. Aufgrund seiner starken Affinität zu Thrombin (k_1 -Werte von 10^{-12} Mol/l) und seines direkten Wirkungsmechanismus ist es von großem Interesse. Seine klinische Anwendung war in der Vergangenheit äußerst beschränkt, da Hirudin nicht leicht in standardisierter Form zugänglich war. Hirudin kann heute gentechnologisch hergestellt werden und daher ist seine klinische Anwendung in der nächsten Zeit zu erwarten.

Beispielsweise werden in der EP-A-04 68 327 pharmazeutische Präparate für die orale Verabreichung beschrieben, die rekombinantes Hirudin enthalten.

Hirudin wurde in den letzten Jahren pharmakologisch intensiv untersucht und die pharmakologischen Daten wurden bei Versuchstieren und am Menschen erfaßt. Hirudin wird in der Leber nicht metabolisiert, sondern in unveränderter Form über die Nieren ausgeschieden. Hirudin hat eine Eliminationshalbwertszeit von etwa 1 bis 2 Stunden und verteilt sich in den extrazellulären Flüssigkeitsräumen des Körpers. Ähnlich wie Heparin wird Hirudin nicht oral resorbiert. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß Hirudin in nahezu allen Thrombomodellen wirksam ist, so auch beim Endotoxinschock und bei experimenteller Koronarthrombose sowie bei der Verhinderung der Reocclusion nach Thrombolyse. Bei klinisch-pharmakologischen Untersuchungen wurden keine immunologischen Reaktionen nachgewiesen. Hirudin hat sich bei klinischen Untersuchungen als Antikoagulans und Antithrombotikum als dem Heparin überlegen erwiesen.

Augenblicklich wird weltweit in vielen Forschungslaboratorien zu synthetischen, insbesondere kleinmolekularen, Inhibitoren Synthesearbeit geleistet. Die synthetischen Thrombininhibitoren wirken auf gleiche Weise wie Hirudin. Am weitesten fortgeschritten sind Untersuchungen mit Derivaten des Benzamidins, wie zum Beispiel mit NAPAP (N α -(2-Naphthylsulfonyl-glycyl)-D,L-amidinophenylalanin-piperidid) und mit sogenannten Tripeptiden. Alle synthetischen Thrombininhibitoren befinden sich augenblicklich in der präklinischen Untersuchung. Ihre Wirkungen sind qualitativ denen von Hirudin gleichzusetzen. Der Metabolismus der synthetischen Thrombininhibitoren unterscheidet sich jedoch von dem des Hirudins. In der Regel werden die Thrombininhibitoren in der Leber oder im Blut metabolisiert. Es ist abzusehen, daß bereits in Kürze derartige Substanzen für die klinische Erprobung zur Verfügung stehen. Der Vorteil gegenüber dem Hirudin ist darin zu sehen, daß die Verbindungen oral verabreicht werden können.

Zu einer sachgerechten Therapie oder Prophylaxe ist es jedoch erforderlich, daß der Gehalt an Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren im Blut laufend bestimmt werden kann, um Unterdosierungen zu vermeiden oder Nebenwirkungen durch Überdosierungen zu verhindern. Mit anderen Worten, es muß ein therapeutisches drug monitoring verfügbar sein. Bis jetzt sind keine Verfahren zur Bestimmung von Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren, insbesondere im Blut, bekannt, die auf einfache Weise durchgeführt werden können.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung von Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren, insbesondere im Blut, zur Verfügung zu stellen, das auf einfache Art und Weise in Krankenhäusern, Arztpraxen und Laboratorien im breiten Umfang angewendet werden und beispielsweise bei der präoperativen Untersuchung zur Erkennung eines Blutungs- oder Thromboserisikos, zur Überwachung der Antikoagulantientherapie bei Thrombose gefährdeten Patienten und bei der Verlaufskontrolle zahlreicher Erkrankungen, zum Beispiel schwerer Infektionen, Leberfunktionsschäden und maligner Erkrankungen, verwendet werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren soll auf leichte Weise durchgeführt werden können, wobei die Geräte verwendet werden sollen, die bereits in Krankenhäusern und Arztpraxen vorhanden sind. Außerdem soll ein Mittel zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung gestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von Hirudin oder synthetischen Thrombininhibitoren im Blut, das dadurch gekennzeichnet ist, daß zu dem Blut ein Prothrombin-Intermediat, eine Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Salz davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen sowie gegebenenfalls Puffer und/oder andere übliche Zusatzstoffe gegeben werden und die Zeit, die von der Zugabe bis zum Beginn der Gerinnung vergeht, gemessen wird.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Mittel zur Durchführung des oben genannten Verfahrens, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es ein Prothrombin-Intermediat, eine Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Salz davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen gegebenenfalls zusammen mit Puffern und/oder anderen üblichen Zusatzstoffen enthält.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt den großen Vorteil, daß es sehr einfach durchzuführen ist und daß die Ergebnisse des Untersuchungstests schnell verfügbar sind, da sie an Eichkurven abgelesen werden können. Das Verfahren kann auf einfache Weise in Krankenhäusern, Arztpraxen und Laboratorien im breiten Umfang durchgeführt werden und erfordert kein besonders ausgebildetes Personal.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Bestimmung von Hirudin oder synthetischen, vorzugsweise kleinmolekularen, Thrombininhibitoren durchgeführt werden. Beispiele für synthetische Thrombininhibitoren sind vor allem die Derivate des Tripeptids Phe-Pro-Arg, wie Boronsäure-Derivate, Argininale, Chlormethylketon-Derivate und Derivate, die an den Aminosäuren modifiziert sind sowie Benzamidin-Derivate und auch sogenannte Hirologe, d. h. synthetische Hirudin-analoge Teilsequenzen. Das Antidotprinzip ist das gleiche wie bei Hirudin.

Der wissenschaftliche Hintergrund dieser Methode beruht auf der Interaktion von Hirudin oder synthetischen Thrombininhibitoren mit einem Prothrombin-Intermediat, wie intermediärem Meizothrombin, einem Zwischen-

produkt der Prothrombin-Thrombin-Umwandlung, oder Meizothrombin-des-Fragment-1. Es handelt sich bei dieser Umwandlung um eine mehrstufige Reaktion, wobei ganz spezielle Proteinbindungen durch limitierte proteolytische Reaktionsschritte gelöst werden. Normalerweise wird bei der Aktivierung der Gerinnungskaskade ein proteolytisch wirksamer Komplex aus aktiviertem Faktor V, Ca^{++} , Phospholipid und Faktor X gebildet, der die Prothrombin-Thrombin-Umwandlung initiiert. Dabei entstehen nur geringe Quantitäten von Intermediate des Faktors II, weil die Prothrombin-Aktivierung an diesem Prothrombinase-Komplex quasi "festphasenartig" erfolgt. Wird die Gerinnung jedoch mit einer spezifischen Schlangengiftfraktion, z. B. aus Echiscarinatus, eingeleitet, dann werden überwiegend "atypische" Intermediate, z. B. Meizothrombin, PIVKA-Meizothrombin oder Meizothrombin-des-Fragment-1, aus Prothrombin gebildet. Diese Intermediate werden durch Hirudin oder synthetische Thrombininhibitoren inaktiviert, nicht aber durch Heparin. Somit ist es möglich, einen Gerinnungstest aufzubauen, bei dem im Blut oder in einem Blutbestandteil durch ein Schlangengift, beispielsweise Echis-Schlangengift, Meizothrombin oder PIVKA-Meizothrombin erzeugt wird, welches durch das in der Probe enthaltene Hirudin inaktiviert wird. Die Affinität des Hirudins und der synthetischen Thrombininhibitoren zu den Prothrombin-Intermediate ist sehr hoch. Sie beträgt zum Beispiel für Meizothrombin $k_1 > 10^{-10}$ mol/l, so daß erst nach vollständigem Verbrauch des Hirudins oder der synthetischen Thrombininhibitoren in der Probe freies Prothrombin-Intermediat, beispielsweise Meizothrombin, entsteht. Dieses Prothrombin-Intermediat, zum Beispiel das Meizothrombin, kann das in der Probe enthaltene Fibrinogen zu Fibrin umwandeln. Diese Fibrinbildung wird durch das Gerinnen der Probe zeitlich dokumentiert. Die Quantifizierung ist dadurch gegeben, daß der Gehalt der Blutprobe an Hirudin die Gerinnungszeit im therapeutischen Blutspiegelbereich linear verlängert und somit eine rasche und problemlose Aussage zuläßt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Zeit, die von der Zugabe der Verbindung zu dem Blut bis zum Gerinnungseintritt vergeht, gemessen. Für die Messung des Gerinnungseintritts sind zahlreiche Methoden bekannt. Am häufigsten wird in den Gerinnungsansatz periodisch ein Platin-Häkchen eingeführt, welches bei der Bildung eines Gerinnsels einen Fibrinfaden aus der Lösung herauszieht. Dieser Zeitpunkt wird dann als Gerinnungsendpunkt registriert. Der Registrierungs Vorgang kann manuell mittels Stoppuhr oder elektrisch durch Auslösung eines Kontaktes, wenn das Platin-Häkchen als Elektrode ausgelegt ist, erfolgen. Weiterhin gibt es automatisierte Methoden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt den großen Vorteil, daß die Adaptierung auf alle Meßprinzipien der Gerinnungsdiagnostik, besonders auch auf automatisierte Methoden möglich ist. Bei Zugabe von chromogenen Thrombinsubstraten zu entsprechenden Plasmaproben ist eine Meßdurchführung in Laborautomaten möglich.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auf einfache Weise durchgeführt werden und erlaubt die Ablesung des Hirudingehalts an einer Eichkurve. Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit Gesamtblut, Blutplasma, aber auch mit Körperflüssigkeiten, wie Urin, Gewebepreßsaft oder Zelleluaten nach Homogenisierung, zu denen eine Quantität Normalplasma gegeben wird, durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren hat den großen Vorteil, daß das Blut noch Heparin enthalten kann, da Heparin das Verfahren nicht stört.

Erfindungsgemäß wird als Prothrombin-Intermediat beispielsweise Meizothrombin, PIVKA-Prothrombin oder Meizothrombin-des-Fragment-1 verwendet. Meizothrombin ist im Handel erhältlich und kann von der Firma Pentapharm in der Schweiz bezogen werden. Meizothrombin, PIVKA-Prothrombin oder andere Prothrombin-Intermediate können aber auch in vitro gebildet werden.

Vier Faktoren des Gerinnungssystems, Faktor II (Prothrombin), Faktor VII, Faktor IX und Faktor X sind, wie im folgenden Schema dargestellt, dadurch gekennzeichnet, daß sie gamma-Carboxyglutaminsäurereste enthalten. Diese gamma-Carboxylierung an der Glutaminsäure erfolgt erst nach der ribosomalen Synthese des "Acarboxy-Faktors" in der Leber mit Hilfe eines Enzymsystems, welches Vitamin K als Cofaktor benötigt.

Die gamma-Carboxyglutaminsäurereste sind für die Gerinnungswirkung essentiell. Sie stellen die nötigen Bindungswerten für Calciumionen dar. Bei Behandlung mit indirekten Antikoagulantien vom Typ der Dicumarole ("Vitamin-K-Antagonisten") kann die postribosomale gamma-Carboxylierung nicht stattfinden und es befinden sich im Blut inkomplette Gerinnungsfaktoren bzw. Acarboxy-Faktoren, denn ihnen fehlen die Calciumbindenden gamma-Carboxy-Gruppen. Diese Gerinnungsfaktoren werden auch PIVKA-Faktoren (PIVKA = proteins induced by Vitamin K antagonists) genannt.

Wenn Plasma von Patienten, die mit derartigen Antikoagulantien vom Dicumarol-Typ behandelt wurden, mit Ecarin versetzt wird, dann entsteht in diesem Plasma aus dem PIVKA-Prothrombin PIVKA-Meizothrombin in der gleichen Weise durch eine limitierte Proteolyse wie dies auch in normalen Plasmaproben mit Prothrombin geschieht.

Dieses PIVKA-Meizothrombin bzw. andere PIVKA-Intermediate haben ihre Bindungsfähigkeit zu Hirudin behalten, sie haben aber keine bzw. wesentlich geringere Wirkungen auf andere Faktoren der Gerinnungskaskade (Plättchen, Fibrinogen, Thrombomodulin u. a.). Erfindungsgemäß können Meizothrombin, PIVKA-Meizothrombin, deren Intermediate und PIVKA-Intermediate aus PIVKA-Prothrombin verwendet werden. Diese können vom Menschen oder von anderen Säugetieren stammen.

Zur Herstellung von Meizothrombin kann beispielsweise immobilisiertes Ecarin in Minisäulen in einer Größe von beispielsweise 2–4 cm³ gepackt werden. Ecarin-Immobilisat (Pentapharm AG, Basel) gelangt in gequollenem Zustand, suspendiert in einer wäßrigen Lösung von Natriumchlorid 0,15 M, Natriumacetat 0,02 M, Prione® (Warenzeichen der Pentapharm AG für eine proteinstabilisierende Polypeptidfraktion aus gereinigtem Schweinehaut-Kollagen) 0,2% und Trichlorisobutanol 0,3%, pH 5,5, zur Auslieferung. 1 g gequollenes Ecarin-Immobilisat produziert aus Bariumcitrat-Eluat bei 37°C, pH 8,4, innerhalb von 30 min 500 bis 700 U amidolytische Aktivität (1 U = 123 NIH-Einheiten), gemessen an Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym® TH).

Dann werden gereinigte Prothrombinfraktionen auf diese Säulen gegeben, und das gebildete Meizothrombin, gegebenenfalls nach Stabilisierung mit Heparin, wird anschließend gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Material kann in Ampullen abgepackt werden und dann für die Verwendung mit einem geeigneten Lösungsmit-

tel rekonstituiert werden.

Zur Herstellung von Meizothrombin-des-Fragment-1 wird dasselbe Verfahren wie für Meizothrombin verwendet. Im Batch-Verfahren ist nur eine längere Reaktionszeit (3—4 h) vorzusehen. Meizothrombin-des-Fragment-1 ist ein Folgeprodukt der Meizothrombin-Aktivierung.

Erfindungsgemäß wird als Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Schlangengift verwendet. Beispiele für Schlangengifte sind Ecarin und die Gifte von Dispholidus-, Rhabdophis-, Bothrops-, Notechis-, Oxyuranus- und Russell-Vipern-Arten. Die Schlangengifte, wie Ecarin sowie immobilisiertes Ecarin, sind im Handel erhältlich und können beispielsweise von der Firma Pentapharm in der Schweiz käuflich bezogen werden.

Erfindungsgemäß wird als Schlangengift bevorzugt Ecarin, eine hochgereinigte Fraktion des Echis-carinatus-Toxins, verwendet. Ecarin spaltet am Arginin 323 des Prothrombins eine Peptidbindung, wodurch das Intermediat Meizothrombin entsteht. Normalerweise erfolgt die weitere Umsetzung durch Autokatalyse bzw. durch Thrombinakzeleration. Bei Vorliegen von Hirudin im Plasma kommt es zur Interaktion zwischen Meizothrombin und Hirudin. Im Gegensatz dazu kann Heparin nicht mit Meizothrombin reagieren. Diese Wirkungen sind in der beigefügten Fig. 1 dargestellt.

Zur Bestimmung des Hirudingegehalts im Blut wird wie folgt vorgegangen: Zu 0,4 ml Heparinblut (20 IE Heparin/ml Blut) werden 0,16 ml Puffer, 0,02 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung und 0,02 ml Ecarin (200 EU/ml) gegeben. Der Gerinnungseintritt wird mittels mechanischer automatischer Gerinnungszeitmessung bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve werden in den Pufferanteil des Gerinnungsansatzes steigende Mengen Hirudin gegeben. Aus der beigefügten Fig. 2 ist ersichtlich, daß über einen Konzentrationsbereich von 0,1—2 μg Hirudin/Gerinnungsansatz eine Linearität besteht. Dadurch sind sehr schnell Aussagen zum Hirudingegehalt einer Blutprobe möglich. Ein weiterer Vorteil besteht in der Verwendung von Vollblut. Die gesamte Meßzeit ist mit etwa 5 min optimal für ein therapeutisches drug monitoring, im Sinne einer bed-side-Diagnostik.

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

In dem nachfolgenden Testbeispiel wurde ein Gerinnungszeit-Meßgerät benutzt, bei dem mittels Magnet im Gerinnungsansatz der Gerinnungseintritt durch Störung eines elektrischen Feldes bei rotierenden Probenröhrchen erfaßt wird. Dadurch ist Vollblut als Probenansatz zu benutzen. Der "Blood Coagulation Timer" Hemochron® Modell 801 der Int. Technidyne Corp. Edison, N.J., USA, verfügt über zwei Testkanäle und ermöglicht dadurch problemlos eine Doppelbestimmung.

BEISPIEL

Im Hemochron-Teströhrchen vom Typ P214 wurden jeweils

0,02 ml CaCl_2 0,1 M

0,02 ml Ecarin 200 EU/ml NaCl

0,16 ml Tris-Puffer 0,05 M pH 7,4 bei 37°C

0,40 ml Testblut

rasch gemischt, die Zeit gestartet, das Teströhrchen in den Gerinnungsautomaten eingesetzt und die Zeit für den Gerinnungseintritt registriert. In gleicher Weise wird verfahren, um eine Eichkurve aufzustellen, aus der man die Hirudinkonzentration bei entsprechender Gerinnungszeit ablesen kann. Dabei werden dem Puffer definierte Hirudinemengen und statt Testblut unbehandeltes Blut zugesetzt. Die Gerinnungszeit verlängert sich mit steigender Hirudinkonzentration.

Bei vier Probanden wurden durch Doppelbestimmung folgende Werte ermittelt:

	Gerinnungs- zeit [sec]	Hirudin/Ger.-an- satz [μg]	Hirudin/ml Blut [μg]
Prob. A	(70; 63) \bar{x} 66,5	0,5	1,25
Prob. B	(79; 86) \bar{x} 82,5	0,9	2,25
Prob. C	(46; 50) \bar{x} 48,0	0,1	0,25
Prob. D	(44; 48) \bar{x} 46,0	0,0	0,00

Es ist erkennbar, daß bei Prob. D eine Unterdosierung bzw. ein Hirudinverbrauch vorliegt. Bei Prob. C und A befindet sich der Hirudinblutspiegel im therapeutischen Bereich und bei Prob. B im toxischen Bereich.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Hirudin und synthetischen Thrombininhibitoren im Blut oder in Blutbestandteilen, dadurch gekennzeichnet, daß zu dem Blut oder dem Blutbestandteil ein Prothrombin-Intermediat, eine Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Salz davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen sowie gegebenenfalls Puffer und/oder andere übliche Zusatzstoffe gegeben werden und die Zeit, die von der Zugabe bis zum Beginn der Gerinnung vergeht, gemessen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Blut oder der Blutbestandteil Heparin enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Prothrombin-Intermediat Meizothrombin, PIVKA-Meizothrombin oder Meizothrombin-des-Fragment-1 und als Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Schlangengift verwendet werden. 5
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Schlangengift Ecarin verwendet wird.
5. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Prothrombin-Intermediat, eine Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Salz davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen gegebenenfalls zusammen mit Puffern und/oder anderen üblichen Zusatzstoffen enthält. 10
6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es als Prothrombin-Intermediat Meizothrombin, PIVKA-Meizothrombin oder Meizothrombin-des-Fragment-1 und als Verbindung, die Prothrombin zu Meizothrombin spaltet, ein Schlangengift enthält.
7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es als Schlangengift Ecarin enthält. 15

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

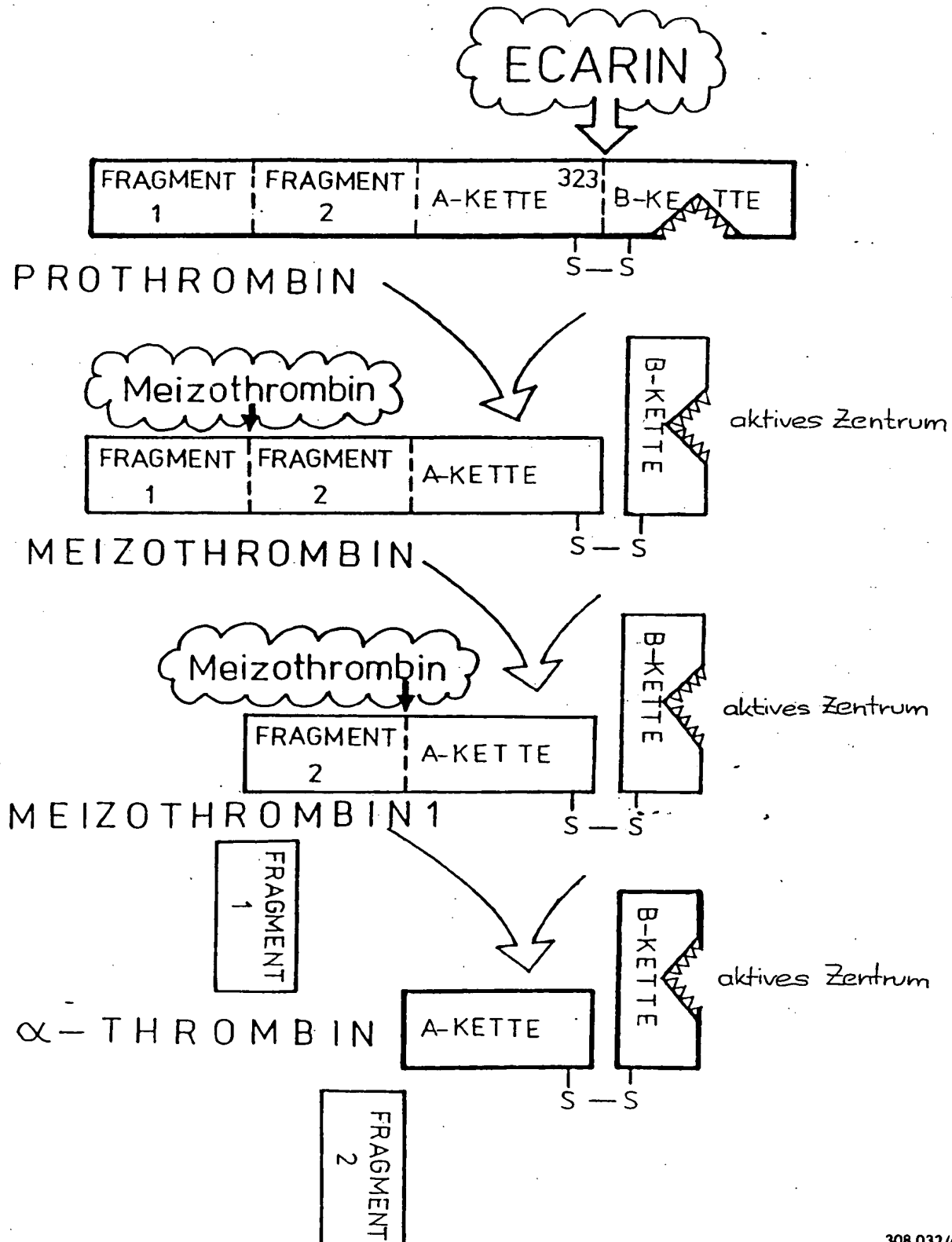
60

65

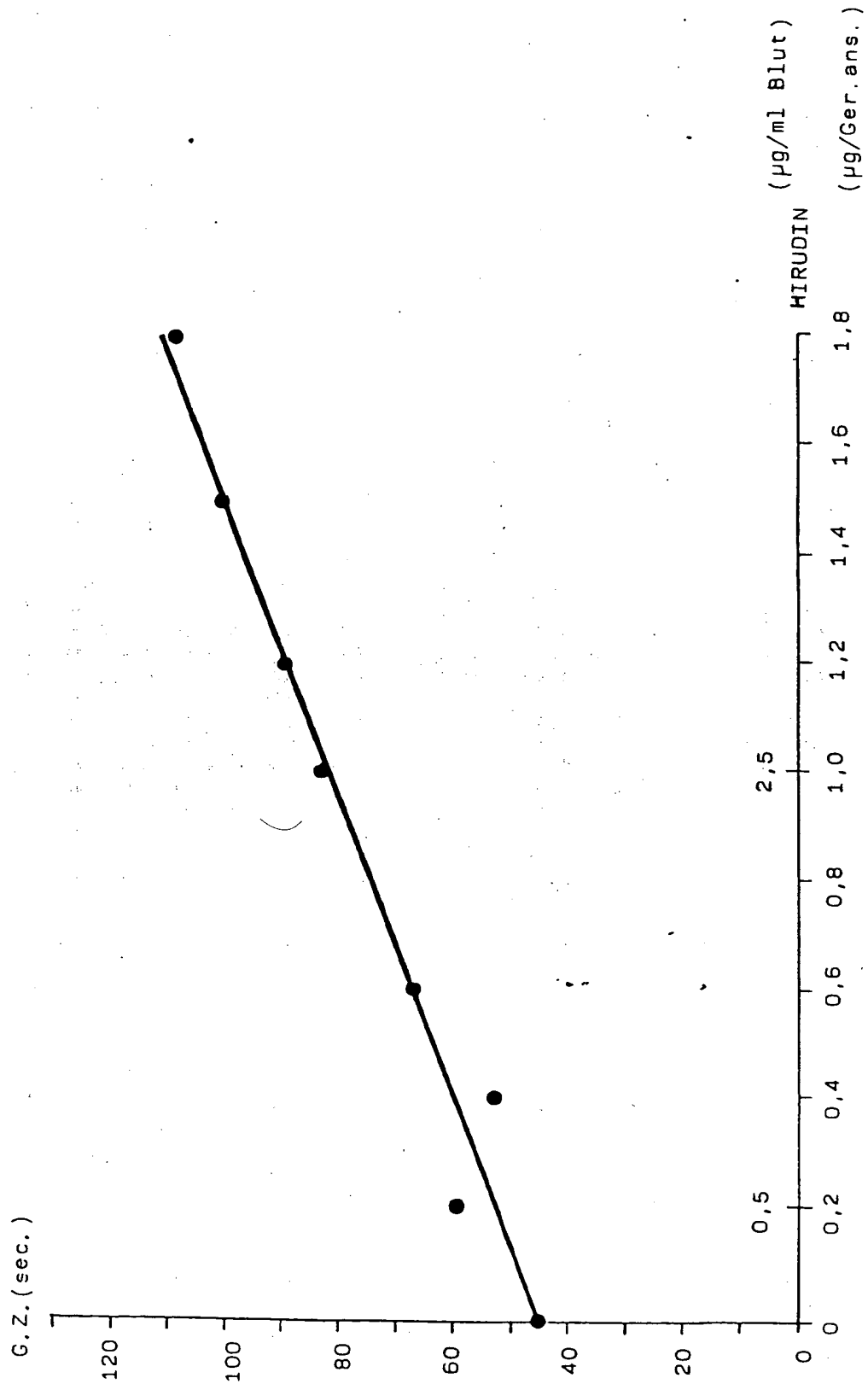
- Leerseite -

Figur 1

SCHEMA DER ECARIN-BEDINGTEN
PROTHROMBIN-AKTIVIERUNG



Figur 2



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 2661080 C2

②① Aktenzeichen: P 26 61 080.0-43
②② Anmeldetag: 22. 6. 76
④③ Offenlegungstag: 30. 12. 76
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 22. 3. 90

⑤① Int. Cl. 5:
C07K 5/08
C 12 Q 1/56
C 12 Q 1/37
G 01 N 33/52

DE 2661080 C2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
23.06.75 CH 8224-75

⑦③ Patentinhaber:
Pentapharm AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Dannenberg, G., Dipl.-Ing., 6000 Frankfurt;
Weinhold, P., Dipl.-Chem. Dr., 8000 München; Gudel,
D., Dr.phil.; Schubert, S., Dipl.-Ing., 6000 Frankfurt;
Barz, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

⑥② Teil aus: P 26 27 925.4

⑦② Erfinder:
Svendsen, Lars Gundro, Reinach, CH

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
Enzyme, 12, 1971, 311-321;

⑤④ Tripeptide und deren Verwendung

DE 2661080 C2

Fig. 1

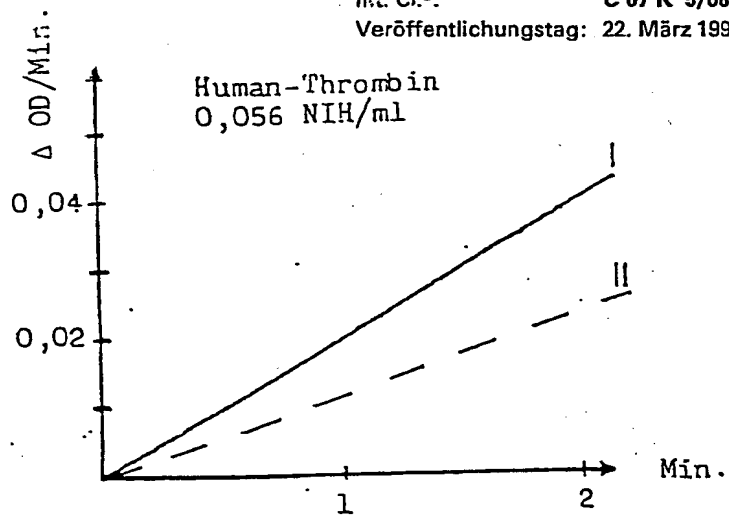


Fig. 2

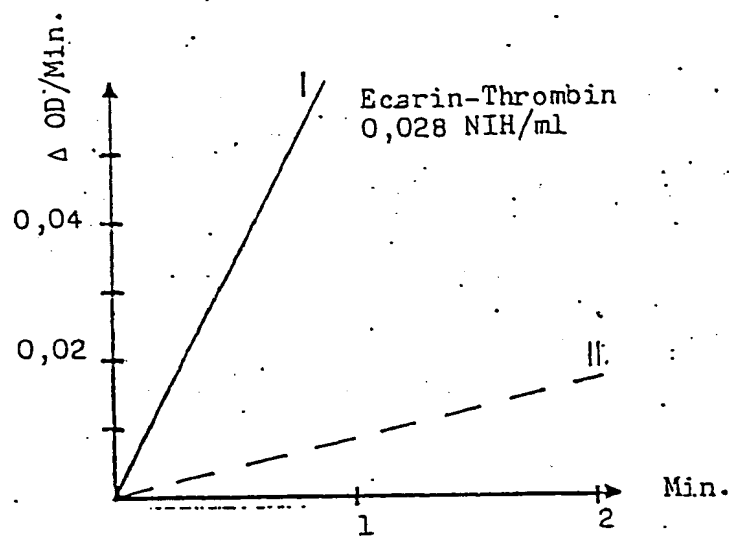
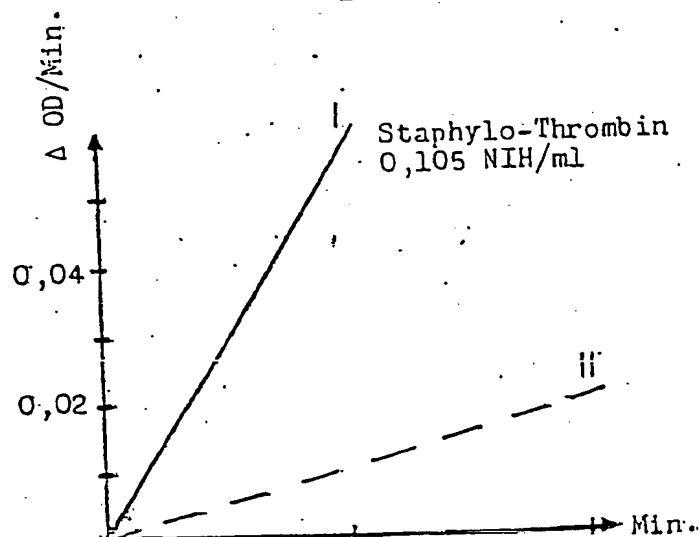


Fig. 3



Beschreibung

Die Erfindung betrifft Tripeptide und deren Verwendung gemäß den voranstehenden Ansprüchen. Die erfindungsgemäßen Tripeptide sind chromogene bzw. fluoreszierende Substrate, die als Reagentien zur quantitativen Bestimmung von proteolytischen Enzymen der Gruppe E.C.3.4.4., welche Peptidketten auf der Carboxyl-

5 seite sowohl von Arginin als auch von Lysin spalten, in Körperflüssigkeiten des Menschen und der Säugetiere sowie in Drüsengiften von Kaltblütlern durch photometrische, spektrophotometrische und fluoreszenzphotometrische Methoden verwendbar sind.

In der DE-OS 23 22 116 ist ein synthetisches Substrat beschrieben, das zur quantitativen Bestimmung von

10 Enzymen der Gruppe E.C.3.4.4., u. a. Thrombin, Plasmin und Trypsin, vorgesehen ist (Enzymnomenklatur: "E.C.") ist die Abkürzung für "Enzyme Committee" der "International Union of Biochemistry". Dieses Substrat weist eine Tripeptidkette der Formel



15 auf, in welcher die N-terminale Aminosäure durch eine Acylgruppe blockiert und die C-terminale Aminosäure durch eine chromogene bzw. fluoreszierende Gruppe substituiert ist, die unter der Einwirkung der genannten Enzyme abgespalten wird. Das dabei gebildete Spaltprodukt kann photometrisch quantitativ bestimmt werden. Aus der pro Zeiteinheit freigesetzten Menge an chromogenem Spaltprodukt kann die enzymatische Aktivität

20 ermittelt werden. In der Tripeptidkette können Phe z. B. durch Ph.Gly, Tyr, 4-Methoxy-Tyr oder 4-Methyl-Phe, Val z. B. durch Ile, Leu, nor-Val, Ph.Gly oder Phe und Arg z. B. durch Lys, Homo-Arg oder Orn ersetzt sein.

Das in der DE-OS 23 22 116 beschriebene Substrat enthält in der Peptidkette mindestens zwei optisch aktive Aminosäurefragmente, die beim synthetischen Aufbau der Peptidkette nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden zur Racemisierung neigen. Das Ausmaß dieser Racemisierung ist von den bei der Synthese angewendeten Reaktionsbedingungen abhängig und schwankt von Ansatz zu Ansatz, da es praktisch ausgeschlossen ist,

25 genau die gleichen Reaktionsbedingungen einzuhalten. Die Bildung geringer Mengen der entsprechenden D-Aminosäuren hat zur Folge, daß die Spaltbarkeit des Substrates durch die Enzyme, insbesondere Thrombin, stark herabgesetzt ist. Wie L. Svendsen et al. [siehe Thromb. Res. 1, 267—278 (1972)] gezeigt haben, wird durch das Ersetzen des L-Phenylalanins durch D-Phenylalanin in der Tripeptidkette die Spaltbarkeit des Substrates um

30 das 160fache herabgesetzt. Schon ein Racemisierungsgrad der N-terminalen Aminosäure von nur 1% bewirkt eine Verminderung der Spaltbarkeit des Substrates von 1,6%. Aus diesem Grund ist dieses bekannte Substrat für Zwecke der Enzymstandardisierung ungeeignet.

In Enzyme 12, 311—321 (1971) ist ein Tripeptidderivat, nämlich N-Carbobenzoxy-diglycyl-L-arginin-2-napht-

35 hylamid, beschrieben, welches durch Trypsin gespalten wird, und deshalb zur Bestimmung des letzteren geeignet ist. Dieses Tripeptidderivat wird jedoch durch Thrombin nicht und durch Plasmin in einem zur Bestimmung des letzteren völlig unzureichenden Ausmaß gespalten.

Die der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe bestand darin, ein Substrat zu synthetisieren, das einerseits eine höhere Spaltbarkeit pro Zeiteinheit durch Enzyme der Gruppe E.C.3.4.4. und andererseits bei der Synthese keine Racemisierung aufweisen sollte. Dadurch sollte das neue Substrat zur Enzymstandardisierung

40 geeignet gemacht werden. Durch die Erhöhung der Spaltbarkeit des Substrates sollte ferner erwirkt werden, daß man für die Enzymbestimmung mit kleineren Probemengen an biologischem Testmaterial, z. B. Blutproben oder Proben anderer Körperflüssigkeiten, auskommen sollte. Es ist dies von praktischer Wichtigkeit, da oft nur sehr geringe Mengen an Probematerial zur Verfügung stehen und man darauf bedacht ist, bei der Entnahme von

45 Proben, z. B. Blutproben bei Kindern und älteren Personen, Lymphproben oder Gewebeproben, die menschlichen Subjekte möglichst zu schonen. Ein weiteres Ziel, das man zu erreichen suchte, war die Vereinfachung der Technik der Probeentnahme durch das Krankenhauspersonal und damit eine Kosteneinsparung.

Zur Lösung der gestellten Aufgabe wurde von der Erkenntnis ausgegangen, daß Thrombin und thrombinähn-

50 liche Enzyme, z. B. das aus Schlangengift hergestellte Produkt Reptilase® sowie Plasmin, das freie α "A"-Kettenfragment aus Humanfibrinogen unter Bildung des Hexadecapeptids Fibrinopeptid A und des Tripeptids Glycyl-prolyl-arginin spalten [s. Birgit Hessel et al. FEBS LETTERS 18, Nr. 2, S. 318—320 (1971)]. Daraus kann geschlossen werden, daß Thrombin, thrombinähnliche Enzyme und Plasmin gegenüber der Struktur des genannten Tripeptids eine besondere Empfindlichkeit aufweisen. Es wurde ferner von der Überlegung ausgegangen,

55 daß das durch Thrombin und thrombinähnliche Enzyme aus dem α "A"-Kettenfragment abgespaltene Tripeptid als N-terminale Aminosäure das optisch inaktive Glycin enthält. Diese Aminosäure eignet sich besonders gut für den Aufbau von Peptidketten, da sie überhaupt nicht racemisieren kann. Das genannte Tripeptid enthält als

mittlere Aminosäure Prolin, das zwar optisch aktiv ist, aber durch die Besonderheit seiner Struktur, die darin besteht, daß das asymmetrische α -Kohlenstoffatom über eine Propylenbrücke mit der α -Aminogruppe zu einem

60 Fünfring verbunden ist, derart stabilisiert ist, daß eine Racemisierung nur unter sehr extremen Bedingungen, die bei den üblichen Peptidsynthesemethoden nie auftreten, stattfinden kann.

Durch Verwendung der im obengenannten Tripeptid Gly-Pro-Arg enthaltenen drei Aminosäuren ist es nun

65 gelungen, ein synthetisches Substrat aufzubauen, welches den oben gestellten Forderungen vollständig entspricht.

Dieses Resultat war an sich überraschend, da man, wie aus der wissenschaftlichen Literatur hervorgeht, bis

dahin angenommen hatte, daß ein Substrat zwangsläufig eine L-Phenylalanin-Gruppe in Stellung 3 zu einer

70 Arginin-Gruppe in Stellung 1 in der Peptidkette aufweisen müsse, um gegenüber Thrombin eine maximale Empfindlichkeit zu besitzen [s. L. Svendsen et al., Thrombosis Research 1, 276 (1972)]. Diese Theorie ist

andererseits durch die Tatsache untermauert, daß Fibrinopeptid A durch Thrombin aus Humanfibrinogen viel

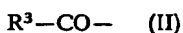
schneller abgespalten wird als das Tripeptid Gly-Pro-Arg. Fibrinopeptid A enthält eine L-Phenylalanin-Gruppe in

der Stellung 9 zur Arginingruppe in Stellung 1. Da jedoch das Fibrinopeptid A, wie allgemein angenommen wird, eine α -Helix bildet, ist der Abstand zwischen der L-Phenylalanin- und der Arginingruppe praktisch gleich wie in einer gestreckten Tripeptidkette, die die L-Phenylalanin- und die Arginingruppe in Stellung 3 zu der Arginingruppe in Stellung 1 enthält [siehe Blombäck et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 24, Suppl. 107, 59 (1969)].

Die erfindungsgemäßen Tripeptide besitzen die Eigenschaft, unter der Einwirkung der genannten Enzyme ein Spaltprodukt der Formel NH_2-R^1 abzugeben, dessen Menge durch photometrische, spektrophotometrische oder fluoreszenzphotometrische Methoden quantitativ meßbar ist.

Die erfindungsgemäßen Tripeptide können mit einer Mineralsäure, z. B. HCl, HBr, H_2SO_4 oder H_3PO_4 , oder einer organischen Säure, z. B. Ameisensäure, Oxalsäure oder Weinsäure, protonisiert sein.

Die in der Formel I durch R^1 bezeichnete Acylgruppe kann durch die folgende Partialformel dargestellt werden:



wobei R^3 insbesondere eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe, wie Methyl, Äthyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl; eine Benzyl-, 2-Phenyläthyl-, 3-Phenylpropyl-, bis 11-Phenylundecylgruppe, eine Cyclohexyl- oder eine Benzylloxygruppe bezeichnen kann.

Sofern die in der Formel I mit R^1 bezeichnete Gruppe eine Sulfonylgruppe ist, kann diese eine Methan- oder Äthansulfonylgruppe, eine Benzolsulfonyl- oder Naphthalinsulfonylgruppe, sein.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der oben definierten Tripeptide als neue Substrate zur quantitativen Bestimmung von proteolytischen Enzymen der Gruppe EC.3.4.4., die Peptidketten auf der Carboxylseite sowohl von Arginin als auch von Lysin spalten, z. B. von Thrombin und thrombinähnlichen Enzymen Ecarin-Thrombin, Plasmin und plasminähnlichen Enzymen, und indirekt von Proenzymen, Enzymaktivatoren und Enzyminhibitoren, in Körperflüssigkeiten des Menschen und der Säugetiere sowie in tierischen Zellextrakten und Drüsengiften von Kaltblütern.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Tripeptide kann nach verschiedenen, z. T. bekannten Methoden, erfolgen.

1. Bei der ersten Methode werden die chromophoren Gruppen (R^2 in Formel I) an der C-terminalen Aminosäuregruppe angehängt. Diese Gruppen üben gleichzeitig die Funktion von C-terminalen Carboxylschutzgruppen während der stufenweisen Verknüpfung der Aminosäuren beim Aufbau der gewünschten Peptidkette aus. Die übrigen Schutzgruppen werden vom Endprodukt selektiv abgespalten, ohne daß die chromophore Gruppe beeinflusst wird. Diese Methode ist z. B. in "Peptide Synthesis" von Miklos BODAN-SZKI et al., Interscience Publishers, 1966, Seiten 163—165, beschrieben.

2. Bei der zweiten Methode wird die chromophore Gruppe an das fertig aufgebaute Peptidgerüst angekuppelt, nachdem zuvor die übrigen Schutzgruppen abgespalten worden sind. Die C-terminale Carboxylgruppe wird in diesem Fall durch racemisierungsfreie enzymatische Esterspaltung freigesetzt. Die zu diesem Zweck verwendeten esterspaltenden Enzyme können entweder frei oder an eine Matrix gebunden sein.

Zum Schutz der N^α -Aminogruppen während des stufenweisen Aufbaus der Peptidketten können die üblichen selektiv abspaltbaren Aminoschutzgruppen verwendet werden. Es handelt sich in erster Linie um Cbo, MeOCbo, NO_2Cbo , MCbo, BOC, TFA oder Formyl. Die α -Carboxylgruppe der Aminosäuren kann nach verschiedenen bekannten Methoden reaktionsfähig gemacht werden, z. B. durch Herstellung der p-Nitrophenylesterderivate, Trichlorphenylesterderivate, Pentachlorphenylesterderivate, N-Hydroxysuccinimidesterderivate und Isolierung dieser Derivate, oder durch Herstellung in situ der Säureazide oder Säureanhydride, die entweder symmetrisch oder asymmetrisch sein können.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe kann auch mittels eines Carbodiimids, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, erfolgen.

Die C-terminale Carboxylgruppe der Peptidderivate kann während des stufenweisen Aufbaus der gewünschten Peptidkette entweder durch die chromophore Amidgruppe oder durch eine Methyl-, Äthyl- oder Isopropylestergruppe geschützt werden. Die übrigen freien reaktionsfähigen Gruppen, die nicht am Aufbau der Peptidkette beteiligt sind, können durch folgende spezielle Maßnahmen blockiert werden: die δ -Guanidinogruppe des Arginins wird durch NO_2 , Tos oder durch einfache Protonisierung geschützt, während die ϵ -Aminogruppe des Lysins durch Cbo, BOC oder Tos geschützt wird.

Bei der Synthese der Tripeptidkette kann man zuerst die N-terminale Aminosäure mit der Blockierungsgruppe (Acyl- oder Sulfonylgruppe) versehen, dann die Carboxylgruppe der blockierten Aminosäure aktivieren und schließlich das so erhaltene aktivierte Aminosäurederivat an das zur Vervollständigung der Peptidkette benötigte Di-peptidderivat anknüpfen.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Substrats nach den obengenannten Methoden ist in den folgenden Beispielen ausführlicher beschrieben.

Die Analyse der gemäß den Beispielen erhaltenen Eluate und Produkte wurde durch Dünnschichtchromatographie ausgeführt. Zu diesem Zweck wurden mit Siliciumdioxidgel überzogene Glasplatten verwendet. Zur Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurden die folgenden Lösungsmittelsysteme verwendet:

A Chloroform/Methanol (9 : 1)

B n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7 : 1 : 2)

C n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1).

Die Chromatogramme wurden zuerst im UV-Licht und dann durch Reaktion mit Chlor/Toluidin (s. G. PATAKI, "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie", Walter de Gruyter & Co.,

Berlin, 1966, S. 125) entwickelt.

Eine Untergruppe der durch die Formel I definierten Tripeptide entspricht der Formel III



in welcher R^1 eine Alkoxycarbonylgruppe mit 2 bis 7 Kohlenstoffatomen, eine Benzyloxycarbonylgruppe, Alkansulfonylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, eine Benzol- oder Naphthalinsulfonylgruppe oder eine Alkanoylgruppe mit 2 bis 9 Kohlenstoffatomen und R^2 eine p-Nitrophenyl-, 2-Naphthyl- oder 4-Methoxy-2-naphthylgruppe darstellen, und deren Salze, wobei Pro und Arg die L-Konfiguration aufweisen.

In der vorliegenden Beschreibung (einschließlich Patentansprüchen) werden folgende Abkürzungen verwendet:

Arg	= L-Arginin
Gly	= Glycin
Lys	= L-Lysin
Pro	= L-Prolin
Ac	= Acetyl
AcOH	= Essigsäure
BOC	= tert.-Butoxycarboxyl
Bz	= Benzoyl
Bzl	= Benzyl
Bz ₂ O	= Benzoessäureanhydrid
Cbo	= Carbobenzoxy
DMF	= Dimethylformamid
DSC	= Dünnschichtchromatogramm
Et ₃ N	= Triäthylamin
HMPTA	= N,N,N',N',N'',N''-Hexamethylphosphorsäuretriamid
LMS	= Lösungsmittelsystem
MeOH	= Methanol
NA	= Naphthylamid
OMe	= Methoxy
OpNP	= p-Nitrophenoxy
pNA	= p-Nitroanilid
2-NA	= 2-Naphthylamid
Smp	= Schmelzpunkt
THF	= Tetrahydrofuran
Tos	= p-Toluolsulfonyl

Die erfindungsgemäßen Tripeptide der Formel I eignen sich allgemein zur Bestimmung von Enzymen der Gruppe EC3.4.4., welche Peptidketten auf der Carboxylseite sowohl von Arginin als auch von Lysin spalten. Zu dieser Gruppe von Enzymen gehören insbesondere Thrombin und thrombinähnliche Enzyme, Ecarinthrombin und Plasmin. Mittels der erfindungsgemäßen Substrate können auf indirektem Wege auch Proenzyme, z. B. Prothrombin und Plasminogen, Enzymaktivatoren und Enzyminhibitoren, z. B. Antithrombine, insbesondere Heparin-Cofaktor (Antithrombin III) und dadurch auch Heparin, ferner Antiplasmin (α_2 -Makroglobulin), Aprotinin, und Plasmininhibitoren, bestimmt werden.

Bei der vollständigen Aktivierung von Proenzymen durch Aktivatoren oder Aktivatorgemische entsteht die äquivalente Menge Enzym, die als solche gemessen werden kann. Die Messung der Aktivatorkonzentration wird indirekt so durchgeführt, daß man die Geschwindigkeit der Bildung des Enzyms aus dem Proenzym bestimmt. Diese Geschwindigkeit ist der Aktivatorkonzentration proportional.

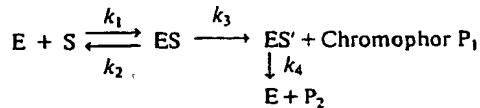
Die erfindungsgemäßen Substrate, z. B. das gemäß Beispiel 1 erhaltene Substrat, nämlich N-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl, wurden zur Bestimmung verschiedener Enzyme in Blutplasma verwendet. Die Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip, daß das durch die enzymatische Hydrolyse des Substrates gebildete Spaltprodukt $\text{NH}_2 - R^2$ ein UV-Spektrum aufweist, das von demjenigen des Substrates verschieden und nach höheren Wellenlängen verschoben ist. So weist das Substrat gemäß Beispiel 1, d. h. N-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl, ein Absorptionsmaximum bei 302 nm und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 12 920 auf. Die Absorption des Substrates ist bei 405 nm praktisch Null. Das bei der enzymatischen Hydrolyse des Substrates gebildete Spaltprodukt $\text{NH}_2 R^2$, d. h. p-Nitroanilin, weist ein Absorptionsmaximum bei 380 nm und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 13 200 auf. Bei 405 nm sinkt der Extinktionskoeffizient nur wenig, d. h. auf 9650.

Durch spektrophotometrische Messung bei 405 nm läßt sich der Grad der enzymatischen Hydrolyse des Substrates, welcher der Menge an abgespaltenem p-Nitroanilin proportional ist, leicht bestimmen. Das im Überschuß vorhandene Substrat stört somit die Messung bei 405 nm nicht. Die Verhältnisse sind für die anderen erfindungsgemäßen Substrate, die eine p-Nitroanilino-Gruppe enthalten, praktisch identisch. Die spektrophotometrische Messung wurde deshalb in allen Fällen bei 405 nm durchgeführt.

Das N-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl (Substrat gemäß Beispiel 1) besitzt den wichtigen Vorteil, daß es eine viermal höhere Wasserlöslichkeit ($> 4 \text{ mg/ml}$) aufweist als das in der DE-OS 23 22 116 beschriebene Thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl (ungefähr 1 mg/ml). Diese höhere Wasserlöslichkeit er-

möglichst es, Enzymbestimmungen in einem viel breiteren Konzentrationsbereich auszuführen. Bei standardisierten biologischen Prüfverfahren ist dies von maßgebender Bedeutung, weil gerade in diesen Fällen Extremwerte genau bestimmt werden können, ohne daß die biologischen Proben vorher verdünnt bzw. konzentriert werden müssen. Der dadurch erzielte Zeitgewinn ist oft ausschlaggebend, da man in der klinischen Praxis danach strebt, Extremwerte für die Diagnose möglichst schnell zu bestimmen. Bei niedriger Substratlöslichkeit ist es nicht möglich, im ganzen Konzentrationsbereich Substratsättigung zu erzielen. Wenn keine Substratsättigung besteht, weichen die Resultate der Enzymbestimmung von der Dosis/Wirkungs-Kurve ab, was bei einem standardisierten biologischen Prüfverfahren von großem Nachteil ist.

Die enzymatische Hydrolysereaktion kann schematisch folgendermaßen dargestellt werden:



E = Enzym

S = Substrat

ES = Enzym-Substrat-Komplex

P₁ und P₂ = Produkte

k₁, k₂, k₃ und k₄ = Geschwindigkeitskonstanten

Dissoziationskonstante für ES = $\frac{k_2}{k_1} = K_m$ (Michaelis-Konstante)

Wenn [S] » [E] und k₄ < k₃, gilt:

$$K_m = \frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} \quad (1)$$

Die Geschwindigkeitskonstante, bei welcher P₁ gebildet wird, ist:

$$v = k_3 \cdot [ES]$$

$$v = \frac{k_3 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Wenn E vollständig an S gebunden ist, so gilt:

$$[ES] = [E] \text{ und}$$

$$v = v_{\max} = k_3 \cdot [E] \quad (3)$$

Lineweaver-Burk-Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (4)$$

Aus der Gleichung (2) folgt, daß die Konstanten K_m und k₃ die Wirksamkeit des Substrats für ein gegebenes Enzym bestimmen. Zur Bestimmung dieser Konstanten wendet man die folgende Methode an:

Man mischt das Enzym und das Substrat in einer Pufferlösung und verfolgt die Hydrolysereaktion während 2 bis 30 Minuten. Die Konzentration des Substrats [S] wird variiert, während die Enzymkonzentration konstant gehalten wird. Wenn die Extinktion (OD/Min = Änderung der optischen Dichte pro Minute) in einem Koordinatensystem als Funktion der Zeit aufgetragen wird, erhält man eine Kurve, deren Tangente im Nullpunkt dem idealen Verlauf der Hydrolyse entspricht. Mit Hilfe dieser Tangente kann man die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse ermitteln. Wenn $\frac{1}{v_0}$ als Funktion von $\frac{1}{[S_0]}$ aufgetragen wird, erhält man ein Lineweaver-Burk-Diagramm (siehe "Kurzes Lehrbuch der Biochemie", P. KARLSON, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967, S. 70), aus welchem sich v_{max} und K_m graphisch ermitteln lassen.

K_m und k₃ = $\frac{v_{\max}}{E}$ wurden unter Verwendung von N-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl (Substrat gemäß Beispiel 1) für Human-Thrombin und Human-Plasmin bestimmt. Mittels der Lineweaver-Burk-Gleichung wurden K_m und v_{max} für die genannten Enzyme ermittelt (das Lineweaver-Burk-Diagramm für Human-Thrombin ist in Fig. 6 der beiliegenden Zeichnungen gezeigt). Da die enzymatische Hydrolyse des Substrats durch Human-Thrombin dem Michaelis-Menton-Gesetz folgt, ist es möglich, große Variationen in der Thrombinmenge genau zu bestimmen. Nach demselben Prinzip wurden K_m und v_{max} für die anderen Enzyme ermittelt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Alle Bestimmungen wurden in Tris-Imidazol-Puffer bei einer Ionen-

stärke von 0,15 und einem pH von 8,4 bei 37°C ausgeführt.

In den beigefügten Zeichnungen sind die Fig. 1 bis 5 graphische Darstellungen, in welchen die durch die hydrolytische Wirkung von Human-Thrombin, Ecarin-Thrombin, Human-Staphylo-Thrombin, Batroxobin (aus Gift von Bothrops moojeni) und Human-Plasmin auf das Substrat gemäß Beispiel 1 hervorgerufene Änderung der optischen Dichte ΔOD als Funktion der Zeit in einem Koordinatensystem aufgetragen ist. Zum Vergleich ist auch die durch die Wirkung der genannten Enzyme auf N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl (Substrat gemäß DE-OS 23 22 116) hervorgerufene Änderung der optischen Dichte aufgetragen. Alle Bestimmungen wurden ausgeführt in Tris-Imidazol-Puffer bei einer Ionenstärke von 0,15, einem pH von 7,9 und bei 37°C. Die Lösungen der beiden Substrate wiesen die gleiche molare Konzentration (1 $\mu\text{Mol/ml}$) auf.

Fig. 6 stellt das Lineweaver-Burk-Diagramm für Human-Thrombin dar.

Die Messungen, der Resultate in den Fig. 1 bis 5 aufgezeichnet sind, wurden wie folgt durchgeführt:

0,25 ml Enzymlösung (0,56 NIH/ml Human-Thrombin, 0,28 NIH/ml Human-Ecarin-Thrombin, 1,05 NIH/ml Human-Staphylo-Thrombin, 4,0 NIH/ml Batroxobin (moojeni), 0,4 CU/ml Human-Plasmin wurden zu 2,0 ml Tris-Imidazol-Puffer (pH=8,4, Ionenstärke=0,15) gegeben. Das Gemisch wurde 2 Minuten bei 37°C präinkubiert. Dann wurde dem Gemisch 0,25 ml wäßrige Substratlösung (1 $\mu\text{Mol/ml}$ des Substrats gemäß Beispiel 1 bzw. des vorbekannten Substrats N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl) bei 37°C zugegeben. Die Zunahme der Absorption wurde spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen und mittels eines Schreibers kontinuierlich verfolgt. Die in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellten Meßresultate wurden unter den oben definierten Testbedingungen ermittelt. Die Menge des gebildeten Spaltproduktes ist ein Maß für die Empfindlichkeit (Spaltbarkeit) der Substrate gegenüber den Enzymen. Bei der Berechnung der pro Minute gebildeten Menge (Nmol) p-Nitroanilin wurde einfachheitshalber ein molarer Extinktionskoeffizient von 10 000 statt 9620 verwendet, da die Relation zwischen den Spaltbarkeiten der verschiedenen Substrate durch die Enzyme dadurch nicht geändert wird. Zur Berechnung der pro Minute gebildeten Menge (Nmol) β -Naphthylamin bzw. 4-Methoxy- β -naphthylamin (Substrate XI und XII) wurde die Probe in einem Fluoreszenzphotometer mit Licht einer Wellenlänge von 350 nm bestrahlt. Die Menge des gebildeten Spaltproduktes wurde durch Messung der Intensität des bei 420 nm emittierten Lichtes ermittelt. Aus der nachfolgenden Tabelle 1 ist die Empfindlichkeit der gemäß den Beispielen 1 bis 13 erhaltenen Substrate gegenüber Human-Thrombin und Human-Plasmin ersichtlich.

Tabelle 1

Aktivität von Human-Thrombin und Human-Plasmin, gemessen mittels der erfindungsgemäßen Substrate bei konstanter Substrat- und Enzymkonzentration. Zum Vergleich die entsprechenden mit N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl ermittelten Werte.

Substratkonzentration 10^{-4}-m Substrate	Menge des pro Minute durch 1 NIH-Einheit Human-Thrombin oder 1 CU-Einheit Human-Plasmin aus den Substraten enzymatisch freigesetzten Spaltproduktes $\text{NH}_2\text{-R}^2$ in Nanomol	
	Human-Thrombin	Human-Plasmin
N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl	28,6	36,0
I	45,7	204,0
II	11,2	20,2
III	18,0	49,5
IV	21,3	60,8
V	2,4	33,8
VI	14,6	47,3
VII	65,8	111,0
VIII	16,2	126,0
IX	86,9	196,0
X	43,8	93,5
XI	28,5	116,9
XII	19,5	95,6
XIII	0,85	150,8

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die gemäß den Beispielen 1 bis 13 erhaltenen Substrate, mit Ausnahme der Substrate II und V, gegenüber Human-Plasmin eine signifikant und in den meisten Fällen wesentlich größere Empfindlichkeit aufweisen als das bekannte N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl.

Aus der Tabelle 1 ist ferner ersichtlich, daß die Empfindlichkeit der aus I, VII, IX und X gebildeten Gruppe von Substraten gegenüber Humanthrombin viel größer ist als diejenige des bekannten Substrats.

Tabelle 2

Aktivität von Human-Ecarin-Thrombin, Human-Thrombinkoagulase und Batroxobin (aus Gift von Bothrops moojeni), gemessen mittels des erfindungsgemäßen Substrates I bei konstanter Substrat- und Enzymkonzentration. Zum Vergleich die entsprechenden mit N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl gemessenen Werte.

Substratkonzentration 10^{-4} -m Substrate	Menge des pro Minute durch die 1 NIH-Einheit entsprechenden Menge Human-Ecarin-Thrombin, Human-Thrombinkoagulase und Batroxobin aus dem Substrat enzymatisch abgespaltenen p-Nitroanilins in Nanomol		
	Human-Ecarin- Thrombin	Human-Thrombin- koagulase	Batroxobin
N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA · HCl	30,7	102	3,26
I	246,4	575	15,81

Tabelle 3

K_m und v_{max} von verschiedenen Enzymen, bestimmt mittels des erfindungsgemäßen Substrates N-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl (I) [graphisch ermittelt aus dem Bineweaver-Burk-Diagramm (Fig. 6)]

Enzym	K_m Mol/Liter Substrat I	v_{max} μ Mol/Liter Substrat I
Human-Thrombin	$5,71 \cdot 10^{-5}$	$5,34 \cdot 10^{-2}$ NIH
Human-Plasmin	$3,57 \cdot 10^{-4}$	$67,3 \cdot 10^{-2}$ CU

Definitionen

Die Thrombin-NIH-Einheit ist diejenige des "US National Institute of Health", und der Thrombinstandard entspricht dem "US Standard Thrombin Lot B-3" (21,7 NIH/mg), herausgegeben am 21.3.1973 von der "Division of Biologics Standards, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20 014, USA".

Die der NIH-Einheit entsprechende Menge Human-Ecarin-Thrombin, Human-Thrombinkoagulase und Batroxobin (moojeni) ist diejenige Menge des Enzyms, die eine Fibrinogenlösung unter Standardbedingungen in der gleichen Zeit zur Gerinnung bringt wie 1 NIH-Einheit Standard-Thrombin. Testbedingungen: Das Gemisch von 0,2 ml einer Lösung von 1 NIH/ml "US Standard Thrombin Lot B-3" in Albuminpuffer (pH=7,2) und 0,2 ml 0,4%iger Rinderfibrinogenlösung in destilliertem Wasser ergibt eine Gerinnungszeit von 20,2 Sekunden.

Die Plasmin CU-Einheit ist die Casein-Einheit, die am Casein unter Standardbedingungen gemessen wird.

Eine Enzymeinheit ist diejenige Menge Enzym, die 1 μ Mol Substrat in einer Minute bei Substratsättigung und bei festgelegter Temperatur, Ionenstärke und pH hydrolysiert. Ein Tausendstel dieser Einheit ist eine Milli-Enzymeinheit (mU), die entsprechend 1 Nanomol Substrat pro Minute unter den obengenannten Bedingungen hydrolysiert.

Eine Human-Thrombin-Einheit (1 U), gemessen mit dem erfindungsgemäßen Substrat I (N-Cbo-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl) bei einer $1,5 \times 10^{-4}$ -molaren Substratkonzentration, einer Temperatur von 37°C, einer Ionenstärke von 0,15 und einem pH von 8,4, entspricht der Menge von 27,1 NIH-Einheiten Human-Thrombin (1 Millieinheit = 0,027 1 NIH-Einheit oder 1 NIH-Einheit = 36,9 Millieinheiten).

Dadurch ist es möglich, kleinere Mengen dieser Enzyme mittels der erfindungsgemäßen Substrate zu bestimmen als mit dem vorbekannten Substrat, was in der klinischen Praxis von größter Wichtigkeit ist, wo oft nur kleine Probemengen zur Verfügung stehen oder wenn die Konzentration der Proben der zu bestimmenden Enzyme, Proenzyme, Proenzymaktivatoren und Enzyminhibitoren bei pathologischen Zuständen extrem gering ist.

Die erfindungsgemäßen Substrate können auch zur Bestimmung von Prothrombin und Antithrombin verwendet werden, wie im folgenden gezeigt wird.

Zur Prothrombinbestimmung wurden zu 0,5 ml Glycinpuffer mit pH 8,4 und einer Ionenstärke von 0,3 5 μ l Citratplasma (Markenprodukt "Ci-TROLTM Normal[®]" der Firma American Hospital Supply Corp., DADE division, Miami) zugegeben. Die Mischung wurde während 30 Sekunden bei 37°C präinkubiert. Dann wurden der präinkubierten Mischung 100 μ l wäßriger Calcium Thromboplastinlösung zugesetzt (Calciumthromboplastin ist ein von der Firma Boehringer, Mannheim, kommerzialisierter Prothrombinaktivator). Die erhaltene Mischung wurde bei 37°C inkubiert. Nach 2 1/4 Minuten Inkubationszeit war die Prothrombinaktivierung vollständig. Nach Inkubationszeiten von mehr als 5 Minuten verschwand ein Teil des aktivierten Thrombins als Folge der Einwirkung der im Plasma enthaltenen Antithrombine. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten wurden der genannten Mischung 1 ml Glycinpuffer mit pH 8,4, einer Ionenstärke von 0,3 und einer Temperatur von 37°C und anschließend 0,25 ml einer $1,5 \times 10^{-3}$ -molaren wäßrigen Lösung des Substrates I zugesetzt. Der Verlauf der Hydrolyse des Substrates wurde durch photometrische Messung der Menge des pro Minute

freigesetzten p-Nitroanilins bei 405 nm verfolgt. Die Zunahme der optischen Dichte betrug 0,162 pro Minute. Aus diesem Wert und dem molaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitrophenylanilins bei 405 nm von 10 000 wurde der Wert von 5,99 mU des aus Prothrombin gebildeten Thrombins pro μ l Plasma errechnet. Daraus folgte, daß 5,99 Einheiten Substrat I Thrombin pro ml Plasma aus dem Prothrombin gebildet worden waren, was 162,3 NIH-Einheiten Thrombin pro ml Plasma entspricht.

5 Zur Antithrombinbestimmung wurde zu 1 ml eines 3 USP-Einheiten Heparin enthaltenden Glycinpuffers mit pH 8,4 und einer Ionenstärke von 0,3 0,1 ml einer wäßrigen Thrombinlösung mit einer Konzentration von 25 bis 40 NIH-Einheiten pro ml bei 37°C zugesetzt. Der erhaltenen Mischung wurden Mengen von 2,5 bis 10 μ l Citratplasma zugesetzt, worauf die Mischung während 30 Sekunden bei 37°C inkubiert wurde. Der inkubierten
10 Mischung wurde sofort 0,25 ml "Polybren"-Lösung (Konzentration 1 mg "Polybren" pro 1 ml 0,3molarer Kochsalzlösung) zugesetzt ("Polybren" ist ein aus 1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylenpolymethobromid bestehendes, von der Firma Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA, vertriebenes Produkt). Die erhaltene Mischung wurde während 30 Sekunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Mischung 0,5 ml einer
15 $0,75 \times 10^{-3}$ -molaren wäßrigen Substrat-I-Lösung zugesetzt. Der Verlauf der Hydrolyse des Substrats durch das von Antithrombin nicht neutralisierte Thrombin wurde durch photometrische Messung der Menge des pro Minute freigesetzten p-Nitroanilins bei 405 nm verfolgt. Dabei zeigte sich, daß die Hemmung des eingesetzten Thrombins durch verschiedene Mengen Citratplasma diesen Mengen proportional war.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

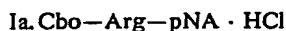
Tabelle 4

Eingesetzte Thrombin- Menge in NIH- Einheiten im Inkubat	Δ OD/Min des eingesetzten Thrombins ohne Plasma	Δ OD/Min mit 2,5 μ l Plasma im Inkubat	mIU/ μ l Plasma errechnet aus Abnahme Δ OD/Min durch 2,5 μ l Plasma	Δ OD/Min mit 5 μ l Plasma im Inkubat	mIU/ μ l Plasma errechnet aus Abnahme Δ OD/Min durch 5 μ l Plasma	Δ OD/Min mit 7,5 μ l Plasma im Inkubat	mIU/ μ l Plasma errechnet aus Abnahme Δ OD/Min durch 7,5 μ l Plasma	Δ OD/Min mit 10 μ l Plasma im Inkubat	mIU/ μ l Plasma errechnet aus Abnahme Δ OD/Min durch 10 μ l Plasma
4,16	0,835	0,750	6,30	0,665	6,31	0,584	6,22	0,505	6,14
3,78	0,760	0,671	6,59	0,588	6,38	0,490	6,69	0,405	6,60
3,26	0,655	0,568	6,45	0,485	6,31	0,390	6,56	0,305	6,51
2,61	0,575	0,441	6,22	0,353	6,38	0,270	6,32	0,180	6,42

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß Variationen in der Menge des in der Inkubationsmischung enthaltenen Thrombins zwischen 2,6 und 4,1 NIH-Einheiten keinen Einfluß auf die Bestimmung des Antithrombins ausüben, wenn die Plasamengen zwischen 2,5 und 10 µl liegen. Es wurden pro µl Plasma $6,40 \pm 4\%$ Substrat-I-Milli-Inhibitoreinheiten Antithrombin gemessen, was $6400 \pm 4\%$ Substrat-I-Milli-Inhibitoreinheiten pro ml Plasma entspricht. Dies bedeutet, daß 1 ml Plasma $173,4 \pm 4\%$ NIH-Einheiten Thrombin zu hemmen vermag.

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Lys: 0,93—Gly: 1,00—Pro: 0,96.

Beispiel 1



In einem Dreihalsrundkolben von 250 ml Inhalt wurden 16,0 g (47,0 mMol) über P_2O_5 im Vakuum getrocknetes Cbo-Arg-OH · HCl in 90 ml absolutem HMPTA unter Feuchtigkeitsausschluß bei 20°C gelöst. Bei Zimmertemperatur wurden der erhaltenen Lösung zuerst eine Lösung von 4,74 g (47,0 mMol) Et_3N in 10 ml HMPTA und dann 16,4 g (100 mMol) p-Nitrophenylisocyanat (100%iger Überschuß) portionenweise zugesetzt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit bei 20°C wurde das HMPTA im Vakuum größtenteils abdestilliert. Der Rückstand wurde mehrmals mit 30%iger AcOH extrahiert. Der Rückstand wurde verworfen. Die vereinigten Essigsäureextrakte wurden zur weiteren Reinigung auf eine mit 30%iger AcOH äquilibrierte Säule eines handelsüblichen Anionenaustauschers auf Dextranbasis ("Sephadex® G-15") aufgetragen und mit 30%iger AcOH eluiert. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde gefriergetrocknet. Man erhielt 12,6 g eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_5\text{Cl}$ ergaben die folgenden Werte:

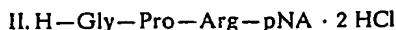
C = 51,29% (51,67%), H = 5,48% (5,42%), N = 17,92% (18,08%), Cl = 7,50% (7,63%).



Unter Feuchtigkeitsausschluß wurden 4,65 g (10 mMol) der Verbindung Ia mit 40 ml 2n HBr in Eisessig unter Rühren eine Stunde bei 20°C behandelt. Das Peptidderivat löste sich dabei unter CO_2 -Entwicklung. Die Reaktionslösung wurde unter intensivem Rühren zu 250 ml absolutem Äther zugetropft, wobei (2 HBr) · H-Arg-pNA ausfiel. Die Ätherphase wurde abgesaugt, worauf die feste Phase noch viermal mit je 100 ml absolutem Äther gewaschen wurde, um das als Nebenprodukt gebildete Benzylbromid sowie den Überschuß an HBr und AcOH zu entfernen. Durch Trocknen im Vakuum über NaOH-Plättchen wurde das deblockierte Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten. Das trockene (2 HBr) · H-Arg-pNA wurde in 25 ml DMF gelöst. Der auf -10°C gekühlten Lösung wurden 1,40 ml (10 mMol) Et_3N zugesetzt. Es bildete sich ein Niederschlag von $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HBr}$, der abfiltriert und mit wenig kaltem DMF nachgewaschen wurde. Dem Filtrat wurden 4,70 g (11 mMol) Cbo-Gly-Pro-OpNP bei -10°C zugesetzt. Nach einigen Stunden war die Temperatur der Reaktionslösung auf 20°C gestiegen. Die Lösung wurde wieder auf -10°C gekühlt und mit 0,35 ml (2,5 mMol) Et_3N gepuffert. Nach weiteren 16 Stunden wurden nochmals 0,35 ml Et_3N bei -10°C zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Reaktionslösung im Vakuum bei 40°C zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 50 ml MeOH gelöst. Nach Zugabe von 0,8 ml (10 mMol) konzentrierter Salzsäure wurde die Lösung im Vakuum bei 20°C zur Trockne eingeeengt. Diese Operation wurde dreimal wiederholt, um das Tripeptidhydrobromid in das Hydrochlorid überzuführen. Das rohe Tripeptidhydrochlorid wurde in 50 ml MeOH gelöst und durch Gelfiltration über eine mit MeOH äquilibrierte Säule von "Sephadex® LH-20" (eines handelsüblichen Anionenaustauschers auf Dextranbasis) vorgereinigt. Zur weiteren Reinigung wurde diejenige Fraktion des MeOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in 30%iger AcOH gelöst. Die Lösung wurde durch Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten Säule von "Sephadex® G-15" gereinigt. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 0,80 ml (10 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Man erhielt 3,64 g (58,8% der Theorie) eines amorphen leichten Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_7\text{Cl}$ ergaben die folgenden Werte (die aus der Bruttoformel ermittelten Werte sind in Klammern gesetzt):

C = 52,09% (52,38%), H = 5,83% (5,70%), N = 18,33% (18,10%), Cl = 5,75% (5,73%).
Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Arg: 0,96—Gly: 1,00—Pro: 0,96.

Beispiel 2



61,91 g (0,1 mMol) der gemäß Beispiel 1 hergestellten Verbindung I wurden unter Feuchtigkeitsausschluß mit 300 ml 3n HCl in Eisessig unter Rühren zwei Stunden bei 35°C behandelt. Das Peptidderivat löste sich dabei unter CO_2 -Entwicklung. Die Reaktionslösung wurde unter intensivem Rühren zu 2 Liter absolutem Äther zugetropft, wobei H-Gly-Pro-Arg-pNA · 2 HCl flockig ausfiel. Die Ätherphase wurde abgesaugt, worauf die feste Phase noch viermal mit je 0,5 Liter absolutem Äther gewaschen wurde, um das als Spaltprodukt

gebildete Benzylchlorid sowie den Überschuß an HCl und AcOH zu entfernen. Durch Trocknen im Vakuum über NaOH-Plättchen wurde das deblockierte Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten. Zur weiteren Reinigung wurde das getrocknete Produkt in 900 ml 30%iger AcOH gelöst. Die Lösung wurde durch Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule gereinigt. Dabei wurde das AcOH-Eluat in zwei Fraktionen aufgeteilt, die sich beide durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließen. Die Hauptfraktion enthielt das gewünschte Produkt und die Nebenfraktion das eingesetzte Ausgangsmaterial. Nach Zugabe von 8 ml (0,1 Mol) konz. HCl zur Hauptfraktion wurde diese gefriergetrocknet. Man erhielt 43,5 g (83,4% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{19}H_{30}N_8C_3Cl_2$ ergaben die folgenden Werte:

C=43,38% (43,77%), H=5,88% (5,80%), N=21,72% (21,49%), Cl=13,41% (13,60%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Arg: 0,95—Gly: 1,00—Pro: 0,94.

Beispiel 3

III. N—2-Phenylacetyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf -10°C wurden 555 μl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 1,13 g (4,4 mMol) Phenyllessigsäure-p-nitrophenyl-ester (Smp. $61,5-62^{\circ}\text{C}$) zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 μl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,99 g (82,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{27}H_{35}N_8O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=54,06% (53,77%), H=5,78% (5,85%), N=18,83% (18,58%), Cl=5,79% (5,88%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Arg: 0,99—Gly: 1,00—Pro: 0,97.

Beispiel 4

IV. N—3-Phenylpropionyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf -10°C wurden 555 μl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 1,19 g (4,4 mMol) 3-Phenylpropionsäure-p-nitrophenyl-ester (Smp. $97-98,5^{\circ}\text{C}$) zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 μl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 2,06 g (83,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{28}H_{37}N_8O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=54,25% (54,50%), H=5,98% (6,04%), N=18,29% (18,16%), Cl=5,63% (5,75%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Arg: 1,02—Gly: 1,00—Pro: 0,98.

Beispiel 5

V. N—Cyclohexylcarbonyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf -10°C wurden 555 μl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 1,10 g (4,4 mMol) Cyclohexylcarbonyl-p-nitrophenyl-ester (Smp. $49-50^{\circ}\text{C}$) zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 μl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,87 g (78,6% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{26}H_{39}N_8O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=52,70% (52,47%), H=6,72% (6,61%), N=19,03% (18,83%), Cl=5,83% (5,96%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Arg: 0,96—Gly: 1,00—Pro: 0,96.

Beispiel 6

VI. N—Caproyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf -10°C wurden 555 μl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 1,17 g (4,4 mMol) Caprylsäure-p-nitrophenyl-ester zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 µl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,99 g (81,4% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der

Bruttoformel $C_{27}H_{43}N_8O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=52,84% (53,06%), H=7,15% (7,09%), N=18,58% (18,34%), Cl=5,73% (5,80%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:

Arg: 0,95—Gly: 1,00—Pro: 0,99.

Beispiel 7

VII. N—Benzolsulfonyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf $-10^{\circ}C$ wurden 555 µl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 780 mg (4,42 mMol) Benzolsulfonsäurechlorid (Smp. 16—17°C) zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 µl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,95 g (78,0% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der

Bruttoformel $C_{25}H_{33}N_8O_7S$ ergaben die folgenden Werte:

C=47,79% (48,03%), H=5,40% (5,32%), N=18,11% (17,93%), S=5,06% (5,13%), Cl=5,61% (5,67%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:

Arg: 1,01—Gly: 1,00—Pro: 0,96.

Beispiel 8

VIII. N—Methansulfonyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf $-10^{\circ}C$ wurden 555 µl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 345 µl (4,44 mMol) Methansulfonsäurechlorid zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 µl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,70 g (75,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der

Bruttoformel $C_{20}H_{31}N_8O_7S$ ergaben die folgenden Werte:

C=42,88% (42,66%), H=5,63% (5,55%), N=20,08% (19,90%), S=5,62% (5,70%), Cl=6,21% (6,30%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:

Arg: 0,99—Gly: 1,00—Pro: 0,96.

Beispiel 9

IX. N—2-Naphthalinsulfonyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf $-10^{\circ}C$ wurden 555 µl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 1,0 g (4,41 mMol) Naphthalin-2-sulfonsäurechlorid (Smp. 74—76°C) zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 µl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,81 g (66,8% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der

Bruttoformel $C_{29}H_{35}N_8O_7S$ ergaben die folgenden Werte:

C=51,88% (51,59%), H=5,19% (5,23%), N=16,75% (16,60%), S=4,62% (4,75%), Cl=5,12% (5,25%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:

Arg: 1,02—Gly: 1,00—Pro: 0,98.

Beispiel 10

X. N—Isobutyloxycarbonyl—Gly—Pro—Arg—pNA · HCl

2,09 g (4 mMol) der gemäß Beispiel 2 hergestellten Verbindung II wurden in 25 ml DMF gelöst. Nach Kühlen auf $-10^{\circ}C$ wurden 555 µl (4 mMol) Et_3N und gleich anschließend 650 µl (5,0 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 µl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,71 g (73,1% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der

Bruttoformel $C_{24}H_{37}N_8O_7Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=49,06% (49,27%), H=6,42% (6,37%), N=19,33% (19,15%), Cl=5,98% (6,06%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:

Arg: 1,01—Gly: 1,00—Pro: 0,94.

Beispiel 11

XI. N—Cbo—Gly—Pro—Arg-2-NA · HCl

XIa. N—Cbo—Arg(NO₂)-2-NA

3,53 g (10 mMol) gut getrocknetes Cbo—Arg(NO₂)—OH wurden in 150 ml THF : DMF (3 : 1) unter Feuchtheitsausschluß gelöst. Nach Abkühlung auf $-10^{\circ}C$ wurden der Lösung 1,39 ml (10 mMol) Et₃N zugesetzt und dann eine Lösung von 1,35 g (10 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester in 20 ml THF innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Temperatur zwischen $-10^{\circ}C$ und $-5^{\circ}C$ gehalten wurde. Der erhaltenen Lösung wurde dann eine Lösung von 1,72 (12 mMol) β -Naphthylamin in 15 ml THF zugetropft, wobei die obengenannte Temperatur eingehalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur während 24 Stunden stehen gelassen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand nacheinander je dreimal mit destilliertem Wasser, dreimal mit 5%iger NaHCO₃-Lösung und wiederum dreimal mit destilliertem Wasser digeriert. Nach dem Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt in MeOH gelöst und durch eine mit MeOH äquilibrierte Säule von "Sephadex® LH-20" chromatographiert. Aus einer Fraktion des Eluates erhielt man 3,75 g der kristallinen Verbindung XIa (78,4% der Theorie) mit Smp. 173—174,5°C, die im DSC in dem LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{24}H_{26}N_6O_5$ ergaben die folgenden Werte:

C=60,82% (60,24%), H=5,63% (5,48%), N=17,48% (16,72%).

XIb. H—Arg-2-NA · HCl

957 mg (2 mMol) der Verbindung XIa wurden im Reaktionsgefäß eines Sakakibara-Apparates eingewogen. 15 ml getrocknetes Fluorwasserstoffgas wurden im Reaktionsgefäß kondensiert. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei $0^{\circ}C$ wurden unter Rühren der Arginin-Nitroschutzgruppe sowie die Carbobenzoxymgruppe abgespalten. Das kondensierte Fluorwasserstoffgas wurde im Vakuum aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert und der Rückstand in DMF gelöst. Um das Aminosäurederivat in das HCl-Salz überzuführen, wurde 0,5 ml (~6 mMol) konz. HCl zugesetzt und die Lösung zur Trockne eingeeengt. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Vorganges wurde der Rückstand in 50 ml 40%iger AcOH gelöst. Zur Reinigung wurde die AcOH-Lösung auf eine mit 30%iger AcOH äquilibrierte "Sephadex® G-15"-Säule aufgetragen und mit 30%iger AcOH eluiert. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 μ l (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 473 mg (63,5% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{16}H_{23}N_5OCl_2$ ergaben die folgenden Werte:

C=51,82% (51,62%), H=6,18% (6,23%), N=17,08% (18,81%), Cl=18,75% (19,05%).

N—Cbo—Gly—Pro—Arg-2-NA · HCl

372 mg (1 mMol) der Verbindung XIb wurden gemäß Beispiel 1 mit 470 mg (1,1 mMol) Cbo—Gly—Pro—OpNP zu der Verbindung XI umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von β -Naphthylamin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 80 μ l (1 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 425 mg (68,1% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{31}H_{38}N_7O_5Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=60,11% (59,65%), H=6,25% (6,14%), N=16,07% (15,71%), Cl=5,59% (5,68%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:

Arg: 0,98—Gly: 1,00—Pro: 0,97.

Beispiel 12

XII. N—Cbo—Gly—Pro—Arg-4-MeO-2-NA · HCl

XIIa. N—Cbo—Arg(NO₂)-4-MeO-2-NA

3,53 g (10 mMol) Cbo—Arg(NO₂)—OH wurden gemäß Beispiel 11, Absatz XIa, mit 2,17 g (12,5 mMol) 4-Methoxy-2-naphthylamin umgesetzt und aufgearbeitet. Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit MeOH äquilibrierten "Sephadex® LH-20"-Säule. Aus einer Fraktion des Eluates erhielt man 3,35 g 65,9% der Theorie) der teilweise kristallinen Verbindung XIIa, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{25}H_{28}N_6O_6$ ergaben die folgenden Werte:

C=59,18% (59,05%), H=5,43% (5,55%), N=16,49% (16,23%).

XIIb. H—Arg-4-MeO-2-NA · 2 HCl

1,02 g (2 mMol) der Verbindung XIIa wurden gemäß Beispiel 11, Absatz XIb zu der Verbindung XIVb umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Behandlung mit Trypsin unter Freisetzung von 4-Methoxy-2-naphthylamin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 320 µl (4 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 570 mg (71,0% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{17}H_{24}N_5O_2Cl_2$ ergaben die folgenden Werte:
C=51,08% (50,88%), H=5,98% (6,03%), N=17,75% (17,45%), Cl=17,55% (17,67%).

XII. N—Cbo—Gly—Pro—Arg-4-MeO-2-NA · HCl

402 mg (1 mMol) der Verbindung XIIb wurden gemäß Beispiel 1, Absatz I, mit 470 mg (1,1 mMol) Cbo—Gly—Pro—OpNP zu der Verbindung XII umgesetzt. Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von 4-Methoxy-2-naphthylamin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 80 µl (1 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 493 mg (75,4% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{32}H_{40}N_7O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=59,01% (58,75%), H=6,10% (6,16%), N=15,19% (14,99%), Cl=5,35% (5,42%).

Die Aminosäureanalyse ergab die zu erwartenden Aminosäuren im richtigen Verhältnis:
Arg: 1,02—Gly: 1,00—Pro: 0,95.

Beispiel 13

XIII. N-Isobutoxycarbonyl—Gly—Pro—Lys—pNA · HCl

XIIIa. N—BOC—N^ε—Cbo—Lys—pNA

19,0 g (50 mMol) der Verbindung N—BOC—N^ε—Cbo—Lys—OH wurden gemäß Beispiel 1, Absatz Ia, in 100 ml HMPTA gelöst und mit 5,06 g (50 mMol) Et₃N und dann mit 16,4 (100 mMol) p-Nitrophenylisocyanat versetzt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung unter Rühren zu 1 Liter 2%iger NaHCO₃-Lösung zugetropft. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und dreimal mit je 0,5 Liter 2%iger NaHCO₃-Lösung, dreimal mit je 0,5 Liter dest. Wasser, dreimal mit je 0,5 Liter 0,5-n HCl und schließlich dreimal mit je 0,5 Liter dest. Wasser gewaschen. Das derart gewonnene Produkt wurde im Vakuum bei 40°C getrocknet und hierauf zweimal mit je 30 ml auf 70°C erhitztem DMF extrahiert, wobei das gewünschte Produkt vollständig herausgelöst wurde, während das Nebenprodukt, N,N'-bis-p-Nitrophenylharnstoff, ungelöst zurückblieb. Die DMF-Lösung wurde im Vakuum bei 40°C eingengt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst, und durch Gelfiltration über einer MeOH äquilibrierten Säule von "Sephadex® LH-20" erhielt man 18,85 g (75,3% der Theorie) der kristallinen Verbindung XIIIa mit Smp. 125—125,5°C, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{25}H_{32}N_4O_7$ ergaben die folgenden Werte:
C=60,49% (59,99%), H=6,35% (6,44%), N=11,48% (11,19%).

XIIIb. N—BOC—Gly—Pro—Lys(ε—Cbo)—p—NA

2 g (4 mMol) der Verbindung XIIIa wurde unter Feuchtigkeitsausschluß und unter Rühren 1 Stunde bei 20°C mit 27 ml Trifluoressigsäure behandelt, wobei sich das Aminosäurederivat unter CO₂-Entwicklung löste. Die Reaktionslösung wurde unter intensivem Rühren zu 200 ml getrocknetem Äther langsam zugetropft, wobei H—Lys(ε—Cbo)—pNA · Trifluoracetat ausfiel. Die Ätherphase wurde mit einem Filtrierstab abgesaugt. Der verbleibende Niederschlag wurde noch viermal mit je 65 ml trockenem Äther gewaschen, um die überschüssige Trifluoressigsäure zu entfernen. Durch Trocknen im Vakuum über NaOH-Plättchen wurde das deblockierte Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten. Das trockene Aminosäurederivat-Trifluoracetatsalz wurde in 20 ml DMF gelöst. Nach Abkühlung auf -10°C wurden der Lösung 555 µl (4 mMol) Et₃N und gleich anschließend 1,73 g (4,40 mMol) BOC—Gly—Pro—OpNP zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1, Absatz I, weiterbehandelt.

Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit MeOH äquilibrierten "Sephadex® LH-20"-Säule. Ausbeute: 2,20 g (84,0% der Theorie) einer amorphen Substanz, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{32}H_{42}N_6O_9$ ergaben die folgenden Werte:
C=59,03% (58,70%), H=6,46% (6,47%), N=12,89% (12,84%).

XIIIc. N—Isobutoxycarbonyl—Gly—Pro—Lys(ε—Cbo)—pNA

1,31 g (2 mMol) der Verbindung XIIIb wurden wie oben beschrieben, deblockiert und in 12 ml DMF gelöst. Nach Abkühlung auf -10°C wurden der Lösung 280 µl (2 mMol) Et₃N und gleich anschließend 285 µl (2,2 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester zugesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gemäß Beispiel 1, Absatz I, weiterbehandelt. Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit MeOH äquilibrierten "Sephadex® LH-20"-Säule. Ausbeute: 1,15 g (87,8% der Theorie) einer amorphen Substanz, die im DSC in den LMS A und B einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{32}H_{42}N_6O_9$ ergaben die folgenden Werte:

C=58,01% (58,70%), H=6,40% (6,47%), N=12,99% (12,84%).

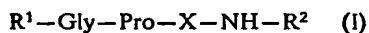
XIII d. N-Isobutoxycarbonyl-Gly-Pro-Lys-pNA · HCl

660 mg (1 mMol) der Verbindung XIII c wurden gemäß Beispiel 2 deblockiert. Reinigung: Gelfiltrierung auf einer mit 30%iger AcOH äquilibrierten "Sephadex® G-15"-Säule. Diejenige Fraktion des AcOH-Eluates, die sich durch Trypsinbehandlung unter Freisetzung von p-Nitroanilin spalten ließ, wurde nach Zugabe von 80 µl (1 mMol) konz. HCl gefriergetrocknet. Ausbeute: 430 mg (77,2% der Theorie) eines amorphen Pulvers, das im DSC im LMS C einheitlich war. Elementaranalyse und Berechnung aus der Bruttoformel $C_{26}H_{33}N_6O_6Cl$ ergaben die folgenden Werte:

C=52,04% (51,75%), H=6,82% (6,70%), N=15,30% (15,09%), Cl=6,18% (6,36%).

Patentansprüche

1. Tripeptide der allgemeinen Formel



in welcher R^1 Wasserstoff, eine Alkanoylgruppe mit 2 bis 9 Kohlenstoffatomen, Benzoyl, eine omega-Phenylalkanoylgruppe mit 2 bis 12 Kohlenstoffatomen im Alkanoylrest, eine Cyclohexylcarbonylgruppe, eine Alkoxycarbonylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen im Alkylrest, eine Benzyloxycarbonylgruppe, eine Alkansulfonylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen oder eine Benzol- oder Naphthalinsulfonylgruppe, R^2 eine p-Nitrophenyl-, 2-Naphthyl- oder 4-Methoxy-2-naphthylgruppe und X eine Arginyl- oder Lysylgruppe darstellen, und deren Salze, wobei die Aminosäurereste die L-Konfiguration aufweisen.

2. N-2-Naphthalinsulfonyl-glycyl-prolyl-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid.

3. N-Benzolsulfonyl-glycyl-prolyl-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid.

4. N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-prolyl-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid.

5. N-Isobutyloxycarbonyl-glycyl-prolyl-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid.

6. Verwendung der Tripeptide gemäß Ansprüchen 1 bis 5 bei der Bestimmung von Thrombin und thrombin-ähnlichen Enzymen, Ecarinthrombin, Plasmin und plasminähnlichen Enzymen, Batroxobin sowie Prothrombin und Antithrombin.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 4

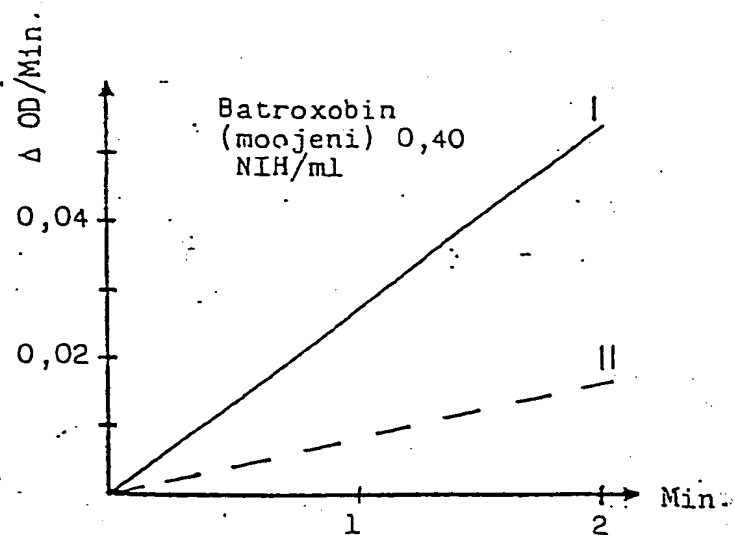


Fig. 5

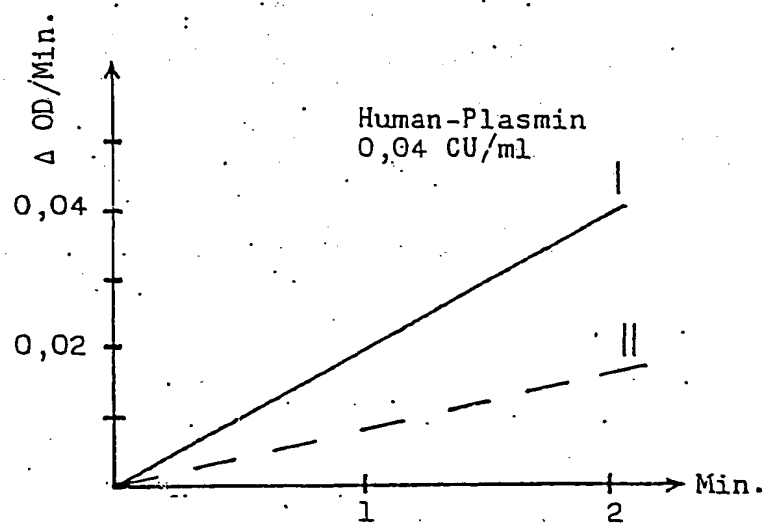


Fig. 6

